

УДК:636.92:519.11:612.176

С. С. Грабовський¹, О. С. Грабовська²**ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ
НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ПРОТЕЇНОВИХ ФРАКЦІЙ ТА РІВЕНЬ КОРТИЗОЛУ
У ПЛАЗМІ КРОВІ КРОЛИКІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ**

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна.

Email: grbss@ukr.net

²Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна.

Email: alice_grb@ukr.net

У статті представлені результати визначення вмісту протеїнових фракцій та рівня кортизолу у плазмі крові кроликів, яким додатково до корму додавали біологічно активні речовини тваринного походження: екстракт селезінки. Як антистресори та імуномодулятори у передзабійний період застосовували біологічно активні речовини з екстракту селезінки. Аерозольне введення екстракту селезінки до корму збільшує порівняно з контролем концентрацію фракції преальбумінів вдвічі ($P \leq 0,05$) та 2,8 разу ($P \leq 0,01$) відповідно та вірогідно знижує рівень кортизолу у плазмі крові кроликів, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм. Отримані нами результати можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету і концентрації стресових гормонів, зокрема кортизолу, на сільськогосподарських тваринах з метою підвищення резистентності організму, корекції та нівелювання стресового стану тварин перед забоєм та покращення якості продукції.

Ключові слова: кролики, передзабійний стрес, екстракт селезінки, білкові фракції, кортизол

**INFLUENCE OF NATURAL IMMUNOMODULATORS ON PROTEIN
FRACTIONS AND CORTISOL CONTENT IN RABBIT BLOOD UNDER STRESS**S. Grabovskyi¹, O. Grabovska²

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named
after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska St., 50, Lviv, 79010, Ukraine.

Email: grbss@ukr.net

²Institute of Animal Biology NAAS, V. Stus St., 38, Lviv, 79034, Ukraine.

Email: alice_grb@ukr.net

The results of determination of protein fractions, cortisol content in blood of rabbits, which further added to the feed of natural origin biologically active substances are presented in the article. As an antistressors and immunomodulators in pre-slaughter period are using of spleen extract biologically active substances were obtained with ultrasound application. The purpose of research — determination of changes of protein fractions, cortisol content in rabbits blood before slaughter and their correction of natural origin biologically active substances (spleen extract).



Object and research methods. The experiment was conducted on 15 rabbits with standard diet. Three groups of rabbits five month of age (5 rabbits each) was formed for research. The spleen extract were using as an biologically active substances to the feed rabbits in pre-slaughter period (five days before slaughter). The extracts were applied to feed by aerosol method (70 °alcohol solution of spleen extract volume of 1.4 ml per rabbit) (group I). The rabbits (group II) received to the feed in the same way of 70 °alcohol solution in the same volume. The control group rabbits received the standard feed in the same volume. The feed eating by rabbits was exercised daily. The rabbits ate food completely. The rabbits slaughter was carried out in the morning. The blood plasma protein fractions separation was carried out by horizontal electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG).

Mathematical treatment of the research results worked statistically using the software package Statistica 6.0 and Microsoft Excel for Windows XP. Probability differences was assessed by Student t-test and results considered likely at $P \leq 0.05$.

Results and discussion. We measured the ratio of blood plasma protein fractions of rabbits, which in addition to the feed fed of natural origin biologically active substances. As a result of research was found that aerosol introduction of the spleen extract to the rabbits feed increases the Prealbumin concentration in rabbits blood plasma of two experimental groups twice ($P \leq 0.05$) and 2.8 times ($P \leq 0.01$) compared to the control.

Cortisol level in rabbits (which further added to the feed of spleen extract (I research group) blood plasma was reliable lower by 40 % ($P < 0.05$) compared to control, that may to indicate decreasing of stress before slaughter. On the rabbits feeding final stage is necessary to consider a pre-slaughter stress and to apply of natural origin biologically active substances. The results which obtained can to use in researches of stress hormones, such as cortisol, on farm animals for organism resistance increasing, correction and avoid their pre-slaughter stress and improve product quality.

Keywords: rabbits, pre-slaughter stress, spleen extract, protein fractions, cortisol

ВСТУП

Стресовий та імунодефіцитний стан організму — невід’ємні один від одного системи. Стрес пригнічує імунну реактивність організму, що призводить до порушення його стану і в результаті — до захворювань різної етіології. Стресовий чинник збуджує гіпоталамус, продукується речовина, яка сигналізує виділення гіпофізом адренокортикотропного гормону, під впливом якого наднирники секретують кортикоїди (Reeder, Kramer, 2005; Sapolsky et al., 2000). Обґрунтування закономірностей розвитку стресу і адаптивних властивостей організму — одна із актуальних проблем, зокрема кролівництва, оскільки найпоширенішими об’єктами імунологічних досліджень є кролики, які мають високореактивну імунну систему (Булгакова, 2011). Порівняно з іншими тваринами кролики найбільш піддатливі до стресового стану, зокрема у результаті відлучення, перегруповання і транспортування тварин, різних технологічних прийомів та за недостатньої фізичної активності (Сапин, Никитюк, 2000; Корнева, 1993; Srivastava et al., 2014; Rizo-Aguilar, et al., 2014; Jen et al., 2013). Під час перевезення підвищуються м’язовий тонус, діурез і

дефекація, збільшуються рефлекторна збудливість і потовиділення і, як результат — загальна дегідратація організму, виникає гіпоксія м'язових і паренхіматозних тканин. Усе це призводить до інтенсифікації катаболізму. Зміни в організмі виявляють впродовж 20–35 діб, а іноді й довше (Булгакова, 2011; Волчегорский и др., 1998; Ибрагимова, Исмагилова, 2013; Сеин, Аксёнов, 2007). Нині як одне з перспективних напрямів підвищення захисних сил організму є використання імуномодуляторів, які безпосередньо впливають на активізацію адаптаційних властивостей імунобіологічного статусу організму тварин (Вишнева, 2012).

Серед застосованих нами імуномодуляторів найбільший вплив на організм тварин і птиці за умов передзабійного стресу мав екстракт селезінки, який містить поліаміни, що власне і є антистресорами та імуномодуляторами: додаткове введення до корму екстракту селезінки підвищувало концентрацію β - і γ -глобулінів та знижувало рівень кортизолу у плазмі крові шурів (Грабовський та ін., 2014), призводило до підвищення концентрації γ -глобулінів у плазмі крові курчат-бройлерів, які з кормом отримували екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку і знижувало рівень кортизолу, що вказує на зменшення стресу перед забоєм (Грабовський, Грабовська, 2014а).

Особливий інтерес викликають дослідження впливу біологічно активних речовин природного походження на співвідношення протеїнових фракцій крові та їх корекцію у передзабійний період, тобто за стресового стану організму. Тому метою роботи було дослідити вплив екстракту селезінки у передзабійний період на рівень кортизолу і співвідношення протеїнових фракцій крові кроликів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослід провели на 15 кроликах породи білий велетень, яких утримували на стандартному гранульованому комбікормі фермерського господарства Бузького р-ну Львівської обл. Для дослідження сформували три групи у кожній по п'ять тварин 5-місячного віку. За п'ять діб до забою використовували екстракт селезінки, одержаний із застосуванням ультразвуку (I дослідна група). Екстракти наносили на комбікорм аерозольним методом (70° спиртовий розчин екстракту селезінки об'ємом 1,4 мл на тварину). Кроликам II дослідної групи таким же чином давали до корму 70° розчин етанолу в аналогічному об'ємі. Кролики контрольної групи отримували стандартний комбікорм. Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти (Directive..., 2010).

Протеїнові фракції плазми крові розділяли у пластинах 7,5 % поліакриламідного гелю (ПААГ). У плазмі крові визначали вміст кортизолу за допомогою твердофазного імуоферментного методу імуносорбційним набором, створеним за принципом конкуренції. Зразок плазми крові з ендogenous кортизолом інкубували у лунці разом з ензимним кон'югатом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивали водою. Кількість зв'язаної пероксидази зворотно пропорційна концентрації кортизолу у зразку. Після додавання субстрату змінювалась інтенсивність забарвлення, що зворотно пропорційна концентрації кортизолу у досліджуваному зразку (Влізло та ін., 2012).

Аналіз результатів досліджень проводили за допомогою пакету програм Statistica 6.0. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз біохімічних показників крові кроликів, що були в умовах стресу перед забоєм, показали негативний вплив його дії на адаптивні механізми організму. У крові кроликів контрольної групи збільшилась концентрація кортизолу на 40 % ($P \leq 0,05$) порівняно з тваринами, яким додатково до основного раціону додавали екстракт селезінки (Рис. 1). Отримані нами дані на кроликах підтверджують результати попередніх досліджень на лабораторних щурах (Грабовський, 2014b).

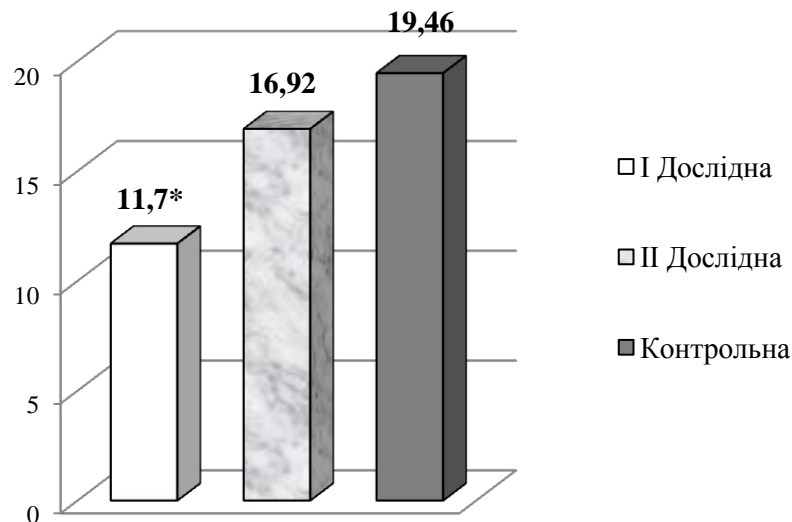


Рис. 1. Рівень кортизолу у плазмі крові кроликів перед забоєм, нг/мл

У плазмі крові кроликів дослідних груп, яким додатково до основного раціону додавали екстракт селезінки та етиловий спирт перед забоєм, збільшилась концентрація фракції преальбумінів вдвічі ($P \leq 0,05$) та

2,8 разу ($P \leq 0,01$) відповідно. На нашу думку суттєвіше збільшення вмісту преальбумінів в II дослідній групі пов'язано з дією етанолу (табл. 1).

Таблиця 1. Співвідношення білкових фракцій плазми крові кроликів перед забоєм (%; $M \pm m$; $n=5$)

Фракції білків (%):	Група тварин		
	I Дослідна	II Дослідна	Контрольна
Преальбуміни	4,40±0,351*	5,64±1,768**	1,90±0,546
Альбуміни	37,72±5,611	33,90±1,669	30,27±15,812
Глобуліни:			
α	15,60±1,821	17,90±1,447	23,58±8,967
β	4,948±2,177	6,93±4,673	5,47±1,544
γ	35,89±3,774	34,82±3,031	34,17±5,686

Примітка: статистично вірогідні різниці: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ (стосовно контролю).

Преальбумін — білок, який синтезується у печінці і метаболізується переважно в нирках. Одна з найважливіших його функцій — транспорт гормонів щитовидної залози (тироксину і трийодтироніну) у крові. У зв'язку з тим, що період напіврозпаду цього білка в організмі дуже короткий (1–2 дні), він є чутливим показником білоксинтезувальної функції печінки. З тієї ж причини преальбумін може слугувати маркером білкової недостатності.

Враховуючи роль нирок у розпаді преальбуміну, дані про його концентрацію у крові використовуються в якості одного з показників, що характеризують функції нирок. Коротший період напіврозпаду преальбуміну порівняно з альбуміном дозволяє його рівню у сироватці крові швидше реагувати на зміни білоксинтезувальної активності печінки. У зв'язку з цим, преальбумін може займати одне з центральних місць у системі діагностичних параметрів функціонального стану печінки (Сорнина, Залевская, 1990).

ВИСНОВКИ

Внесення до корму екстракту селезінки кроликам дослідної групи впливає на рівень кортизолу у плазмі крові кроликів, які отримували екстракт селезінки був вірогідно нижчим порівняно з тваринами контрольної групи, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм. Спиртовий екстракт селезінки збільшує концентрацію преальбумінів.

Перспективою подальших розвідок є дослідження протеїнових фракцій у крові свиней та великої рогатої худоби за використання імуномодуляторів та антистресорів, які містяться в екстракті селезінки, за умов передзабійного стресу.



ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Atrial fibrillation pacing decreases intravascular shear stress in a New Zealand white rabbit model: implications in endothelial function / Jen N., Yu F., Lee J. et al. // *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. — 2013. — V. 12. — № 4. — С. 735–745.

Official Journal of the European Union L276/33, 2010. Directive 2010/63/eu of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.

Physiological stress in volcano rabbit *Romerolagus diazi* populations inhabiting contrasting zones at the Corredor Biologico Chichinautzin, Mexico / A. Rizo-Aguilar, J. A. Guerrero, A. M. Montoya-Lara, C. Valdespino // *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*. — 2014. — V. 79. — № 6. — P. 357–361.

Reeder D. M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history / D. M. Reeder, K. M. Kramer // *J. Mammal.* — 2005. — V. 86. — P. 225–235.

Sapolsky R. M. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions / R. M. Sapolsky, L. M. Romero, A. U. Munck // *Endocr. Rev.* — 2000. — V. 21. — P. 55–89.

Stress Induced Acral Lick Dermatitis in a Domestic Rabbit: A Case Report / M. Srivastava, A. Ahuja, S. Kachhawaha // *Case Reports in Veterinary Medicine*. — 2014. — 12. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/142813>

Булгакова О. С. Иммуитет и различные стадии стрессорного воздействия / О. С. Булгакова // *Успехи современного естествознания*. — 2011. — № 4. — С. 31–35.

Вишневецкая Т. Я. Анализ гематологических показателей у кроликов в условиях стресса и его иммунокоррекции // *Инновационному развитию АПК и аграрному образованию — научное обеспечение: материалы Всероссийской научн.-практ. конф. В 3-х т. Т. 2 / ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА*. — Ижевск: ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2012. — С. 10–15.

Влізла В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. Львів : Сполом, 2012. - 764 с.

Волчегорский И. А. Роль иммунной системы в выборе адаптационной стратегии организма / И. А. Волчегорский, И. И. Долгушин, О. Л. Колесников. — Челябинск : Наука, 1998. — 128 с.

Грабовський С. Вплив імуномодуляторів природного походження на концентрацію білкових фракцій і рівень кортизолу у плазмі крові щурів за умов стресу / С. Грабовський, О. Грабовська, Д. Остапів // *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. — 2014. — Вип. 67. — С. 29–34.

Грабовський С. С. Вплив імуномодуляторів природного походження на вміст білкових фракцій, кортизолу та глутатіону в плазмі крові курчат-бройлерів за

умов стресу / С. С. Грабовський, О. С. Грабовська // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4. – Том 1(113). – С. 57–61.

Грабовський С. С. Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету і рівень кортизолу в крові щурів за умов стресу / Біологічні студії / *Studia Biologica*. – 2014. – Т. 8. – №1. - С. 93–102.

Ибрагимова Л. Л. Применение гомеопатического препарата «Фоспасим» для повышения адаптационной способности кроликов при транспортировке / Л. Л. Ибрагимова, Э. Р. Исмагилова // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 8. – С. 376–379.

Корнева Е. А. О взаимодействии нервной и иммунной систем / Е. А. Корнева // *Иммунология*. – СПб. : Наука, 1993. – С. 7–9.

Сапин М. Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – М.: Джандар, 2000. – 184 с.

Сеин, Б. С. Интерьерные показатели у кроликов при иммобилизационном стрессе / Б. С. Сеин, А. А. Аксёнов // *Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: материалы XI Международной научно-производственной конференции*. – Белгород, 2007. – С. 217.

Соркина Д. А. Структурно-функциональные свойства белков / Д. А. Соркина, И. Н. Залевская. – Киев : Вища школа, 1990. – 215 с.

REFERENCES

Bulgakova, O. S. (2011). Immunity and the various stages of stress exposure. *The successes of modern science*. 4, 31–35.

Grabovskyi, S. S., Grabovska, O. S., Ostapiv, D. D. (2014). Natural origin immunomodulators influence on protein fractions concentration and cortisol level in rats blood at pre-slaughter stress. *Visnyk of Lviv Univ. Biology Series*. 67, 29–34.

Grabovskyi, S. S., Grabovska, O. S. (2014). Natural origin immunomodulators influence on protein fractions, cortisol and glutathione content in broiler chickens blood under stress. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 4(113), 57–61.



- Grabovskyi, S.S. 2014. Effect of natural immunomodulators influence on cellular immunity indices and cortisol level in rat's blood at pre-slaughter stress. *Studia Biologica*. 8 (1), 93–102.
- Ibragimova, L. L., Ismagilova, Je. R. (2013). The use of homeopathic medication «Fospasim» to enhance the adaptive capacity of rabbits during transport. *Fundamental research*. 8, 376–379.
- Korneva, E.A. (1993). On the interaction of the nervous and immune systems. In *Immunology*. Saint Petersburg: Nauka.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union L276/33. 86/609/EC. 20.10.2010.
- Reeder, D. M., Kramer K. M. (2005). Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *J. Mammal*. 86, 225–235.
- Rizo-Aguilar, A., Guerrero, J. A., Montoya-Lara, A. M., Valdespino, C. (2014). Physiological stress in volcano rabbit *Romerolagus diazi* populations inhabiting contrasting zones at the Corredor Biologico Chichinautzin, Mexico. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*. 79(6), 357–361.
- Sapin, M. R., Nikitjuk, D. B. (2000). The immune system, stress and immune deficiency. Moscow: Dzhandar.

- Sapolsky, R. M., Romero L.M., Munck. A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Sein, B. S., Aksjonov A. A. (2007). Interior indicators in rabbits during immobilization stress. Problems of agricultural production at the present stage and their solutions. Proceed. XI International Scientific-Industrial conference. Belgorod.
- Sorkina, D. A., Zalevskaja, I. N. (1990). Structural and functional properties of proteins. Kiev: Vyshha shkola.
- Srivastava, M., Ahuja, A., Kachhawaha, S., Singh, N. K., Sharma, A., Kachhawa, J. P. (2014). Stress Induced Acral Lick Dermatitis in a Domestic Rabbit: A Case Report. *Case Reports in Veterinary Medicine.* 12.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/142813>
- Vishnevskaja, T. Ja. (2012). An analysis of hematological parameters of rabbits under stress and immune. Innovative development of agribusiness and agricultural education — scientific support: Materials of All-Russian Scientific-Practical Conference. Izhevsk: Izhevsk State Agricultural Academy.
- Vlizlo, V. V., Fedoruk, R. S., Ratych, I. B. (2012). Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary. Reference book. Lviv: SPOLOM.
- Volchegorskij, I. A., Dolgushin, I. I., Kolesnikov, O. L. (1998). The role of the immune system in the organism adaptation strategy selection. Cheljabinsk: Nauka.



Поступила в редакцію 22.07.2015

Как цитировать:

Грабовський, С.С., Грабовська, О.С. (2015). Вплив імуномодуляторів природного походження на концентрацію протеїнових фракцій та рівень кортизолу у плазмі крові кроликів за умов стресу. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 5 (2), 93-102. **crossref** <http://dx.doi.org/10.7905/bbmspu.v5i1.979>

© Грабовський, Грабовська, 2015

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)